

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 56-121484
(43)Date of publication of application : 24.09.1981

(51)Int.Cl.

C12N 9/12
//(C12N 9/12
C12R 1/01)
(C12N 9/12
C12R 1/15)

(21)Application number : 55-024557 (71)Applicant : TOYOBO CO LTD
(22)Date of filing : 27.02.1980 (72)Inventor : AISUI SHIGENORI
TAKENAKA NOBUHIKO
ANDO MINORU

(54) PREPARATION OF GLYCEROL KINASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To prepare glycerol kinase having improved stability efficiently, by cultivating a microorganism belonging to the genus Cellulomonas or Corynebacterium.

CONSTITUTION: A microorganism, e.g. Cellulomonas flavigena IFO-12680 or Corynebacterium xerosis IFO-12684, which belongs to the genus Cellulomonas or Corynebacterium and has the ability to produce glycerol kinase is inoculated into a nutrient culture medium and cultivated to collect the glycerol kinase from the resultant culture.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—121484

⑪ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和56年(1981)9月24日

C 12 N 9/12

7349—4 B

// (C 12 N 9/12

C 12 R 1/01)

(C 12 N 9/12

C 12 R 1/15)

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ グリセロールキナーゼの製造法

敦賀市東洋町2番2号

⑮ 特 願 昭55—24557

⑯ 発 明 者 安藤 實

⑰ 出 願 昭55(1980)2月27日

敦賀市東洋町1番7号

⑱ 発 明 者 愛水重典

⑰ 出 願 人 東洋紡績株式会社

敦賀市東洋町9番3の307号

大阪市北区堂島浜二丁目2番8

⑱ 発 明 者 竹中信彦

号

明 細 書

1. 発明の名称

グリセロールキナーゼの製造法

2. 特許請求の範囲

セルロモナス属またはコリネバクテリウム属に属し、グリセロールキナーゼ生産能を有する微生物を栄養培地に培養し、該培養物からグリセロールキナーゼを採取することを特徴とするグリセロールキナーゼの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、グリセロールキナーゼを効率良く製造する方法に関する。

従来、グリセロールキナーゼ (EC 2. 7. 1. 30) (以下 GK と略する) はプロビオニバクテリウム属、アセトバクター属、アエロバクター属、キヤンジダ属に属する微生物から生産されるものが知られている。

GK はリボプロテイン・リパーゼ及びグリセロール-3-リン酸脱水素酵素あるいはグリセロー

ル-3-リン酸オキシダーゼと組み合わせることにより、血清中のトリグリセライドの定量に利用出来ることが知られており、安定性の優れた GK を安価に工業的に製造する方法を提供することが強く望まれている。

本発明者等はかかる要望に応えるべく工業的に安価に GK を製造する方法について鋭意研究を重ねた結果、セルロモナス属およびコリネバクテリウム属に属する微生物を培養したときに、菌体中に安定性の優れた GK が著量に生産されることを見出し、本発明を完成するに到つた。すなわち本発明はセルロモナス属またはコリネバクテリウム属に属し、グリセ^{ニル}ロールキナーゼ生産能を有する微生物を栄養培地に培養し、該培養物からグリセ^{ニル}ロキナーゼを採取することを特徴とするグリセ^{ニル}ロキナーゼの製造法である。

本発明において使用可能な菌株は、例えばセルロモナス・フラビゲナ (Cellulomonas flavigena) I
↓ FO 12680, コリネバクテリウム・ゼロシス
I
(Corynebacterium xerosis) ↓ FO 12684 などが挙げられ

るが、これらの菌の他、セルロモナス属、コリネバクテリウム属の細菌に属し、GKを生産する菌は、すべて本発明方法において使用することが出来る。

本発明では、セルロモナス属、コリネバクテリウム属に属しGK生産能を有する細菌類を、栄養培地で培養することにより、GKが菌体中に生産蓄積される。得られたGKは常法に従い抽出・精製することによつて酵素製品を得ることが出来る。更に具体的に説明すると、前記各属のGK生産能を有する細菌を栄養培地、例えば適当な糖質、窒素源、無機塩類を含む培地又はGK生産能を高めるためにグリセロールおよび有機促進物質を含む栄養培地で培養し、GKを菌体中に蓄積せしめるのである。ここで糖質にはグルコース、シクロースなどの単糖類、二糖類あるいは蔗糖、デンプン加水分解物などの糖類が使用出来る。窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、脱脂大豆、アンモニウム塩などが使用される。無機塩

類としては、ナトリウム、カリウム、マンガ、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、鉄などの金属塩類や硫酸、リン酸、塩酸、硝酸などの塩類が使用できる。有機促進物質としては酵母エキスやペプトン、肉エキス、コーンステープリカーなどが良い。更に本発明においては酵素の誘導物質としてグリセロールおよびグリセロールを含有する物質を上記栄養培地に添加すればより大量のGKを生成せしめることが出来る。これらの添加物の添加は培養当初からでも培養途中に行つてもよい。添加量としてはグリセロールとして10~50g/lの割合で添加すれば良い結果が得られる。

培養温度は通常28~35℃の範囲が好ましく、培養時のpHは6.0~8.5が適当である。かくして15~30時間培養すれば菌体中にGKが著量に生成する。

かくして得られたGKを含む菌体を濾過または遠心分離によつて分別し、適当な緩衝液に懸濁後、磨砕、超音波処理、機械的圧縮または自己消化などの常法に従い破砕して酵素を抽出する。その抽

出液から不溶物を濾過または遠心分離によつて分別した後、濾液または上清から硫酸アンモニウム、芒硝などによる塩析あるいはアセトン、アルコール等を用いる溶媒沈殿などの常法に従い酵素製品を得る。さらに高度に精製された酵素製品を得るには、イオン交換体を応用した吸着溶出法およびゲル濾過法などを用いれば良い。

GKの酵素活性はグリセロールとATPを基質として反応した場合、生成するグリセロール-3-リン酸をNADとグリセロール-3-リン酸脱水素酵素の共存下、NADHの生成量として340nmの吸光度の増加を分光光度計で測定することによつて算出する。

具体的にはグリセロール10μモル、ATP 5μモル、NAD 1.4μモル、MgCl₂ 12μモル、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素18単位、グリシン-ヒドラジン緩衝液(pH 9.8) 600μモルを含む反応混液3.28 mlに酵素液0.05 ml(20mM K-リン酸緩衝液で希釈)を混合し、25℃で反応開始から4分間340nmの波長における紫外部

吸収の増加を測定し、その直線部分から1分間当りの吸光度の増加を算出した。すなわち対照として上記組成でグリセロールの代りに水を用いて同様の操作を行い、試験液の340nmの吸光度の増加から対照のそれを差し引いた。NADHの340nmにおける分子吸光係数として($\epsilon = 6.22 \times 10^3$)を用い、差し引いた吸光度値から生成するNADH量を求め、これをもとにして試料中の酵素力価を算出した。

酵素力価の表示は上記条件下で1分間に1μモルのNADHを生成せしめる酵素量を1単位として行う。

本発明によつて得られるGKの理化学的性質をセルロモナス・フラビゲナ I P O 12680 起源のもの(後記の実施例1で得られた比活性20単位/μの精製酵素)を代表例として示す。

(1)作用

本酵素はATPの共存下にグリセロールをリン酸化し、グリセロール-3-リン酸とADPを生成する反応を触媒する。

(2) 基質特異性

本酵素はグリセロール以外にも、ジヒドロキシアセトン、D,L-グリセロアルデヒドにも作用するが、他のポリオール及びアルコール類には作用しなかつた(第1表参照)。

第1表 GKの基質特異性

基 質 (12mM)	相 対 活 性 (%)
グリセロール	100
ジヒドロキシアセトン	135
D,L-グリセロアルデヒド	69
エチレングリコール	0
1,2-プロパンジオール	0
1,3-プロパンジオール	0.07
1,3-ブタンジオール	0
1,4-ブタンジオール	0
2,3-ブタンジオール	0
D-マンニトール	0
D-ソルビトール	0
D-グルコース	0
リビトール	0
メタノール	0
エタノール	0

(4) 作用適温の範囲

本酵素の作用最適温度は前記の活性測定条件下において、50℃付近にある。

(5) pH、温度などによる失活条件

本酵素はpH 7.5、15分間の処理の場合、40℃まで安定で、45℃でも96%の活性が残存するが、70℃の処理では完全に失活する。

(6) 種々薬剤の影響

本酵素活性は第2表に示す如く、 Ag^+ イオン、 Hg^{2+} イオンによつて顕著に阻害される。またパラクロマーキユリベンゾエート(PCMB)のようなチオール基阻害剤によつても活性が顕著に阻害される。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、o-フェナンスロリンのような金属キレート剤では全く影響を受けなかつた。

以下余白

なお相対活性は下記反応系で測定した。

反 応 液 組 成	濃 度 μ moles
K-リン酸緩衝液 (pH 7.5)	75
ATP	3.3
$MgCl_2$	15.0
ホスホエノールビルビン酸	1.65
基 質	40.0
ビルビン酸キナーゼ(結晶)	150 μ g
乳酸脱水素酵素(結晶)	50 μ g
酵素液	

反応全液量 1.6ml、反応温度 25℃

(活性は NADH の減少速度 (ADP の生成速度) を測定した)

またグリセロールまたは ATP に対する K_m 値は夫々 $4.4 \times 10^{-5} M$ または $4.3 \times 10^{-4} M$ であつた。

(8) 至適 pH および安定 pH 範囲

本酵素の至適 pH は 9.8 付近にある。本酵素の安定 pH 域は 25℃、20 時間処理で pH 5.5 ~ 10.0 の範囲にあり、極めて広範囲の pH 域で安定である。更に最も安定な pH は 7.5 付近で、該 pH では、40℃、1 時間処理でも 100% の活性が残存する。

第2表 GK 活性に及ぼす各種薬剤の影響

(0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中、30℃、1 時間処理;
GK 40 単位/ml)

薬 剤	濃 度 (mM)	残 存 活 性 (%)
無 添 加	—	100
$MgCl_2$	2	100
$CaCl_2$	2	100
$BaAc_2$	2	100
$FeCl_3$	2	75
$CoCl_2$	2	100
$MnCl_2$	2	100
$ZnAc_2$	2	99
$NiCl_2$	2	98
$CuSO_4$	2	100
$PbAc_2$	2	88
$AgNO_3$	2	0
$HgCl_2$	2	0
PCMB	2	22
モノヨード酢酸	2	96
NaF	2	97
NaN_3	20	97
EDTA	5	101
o-フェナンスロリン	2	96
α, α' -ジピリジル	2	92
$Na_2B_4O_7$	50	100
トリトン X-100	0.1%	99

AC: CH_3COO

(7) 分子量および等電点

セファデックス G-200 のゲル濾過法により、本酵素の分子量は約 200,000 と算出された。またキャリアーアンフロイトを用いた焦点電気泳動法で測定した本酵素の等電点は 4.2 であつた。

本発明により得られる GK は従来の GK に比して、熱あるいは pH に対して安定である。

次に本発明を実施例により説明する。実施例において % は重量 % を示す。

実施例 1

グリセロール 2.0 %、ポリペプトン 2.0 %、酵母エキス 0.2 %、リン酸 2 カリウム 0.7 %、塩化ナトリウム 0.2 %、硫酸マグネシウム ($7H_2O$) 0.02 %、消泡剤アデカノール LG-126 (旭電化製) 0.04 % からなる培地 (pH 7.4) 200 ml を 300 ml 容のジャーファメンターに仕込み、120℃ で 30 分間蒸気滅菌した。他方、同組成培地を用い 2 l 容肩付フラスコで 30℃ 20 時間セルロモナス・フラビゲナ^I F012680 振盪培養しておいた培養物 200 ml を前記培地に無菌的に接種し、30℃

添加溶解して、水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.5 に調整した。該酵素液を、予め 6 % 飽和硫酸アンモニウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化しておいたフェニルセファロース CL-4B (ファルマシア製、スウェーデン) を充填したカラム (100 ml 容量カラム) に通じ、GK を吸着させた。更に担体の平衡化に使用した緩衝液で洗い流した後 10 % にエチレングリコールを溶解した同緩衝液と 30 % にエチレングリコールを溶解した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) とで濃度勾配をつくり、徐々に硫酸アンモニウム濃度を下げると共にエチレングリコール濃度を上げながら GK を溶出させた。溶出された GK の活性区分を集め、硫酸アンモニウムの 70 % 飽和で前記と同様に塩析を行つた。沈殿する GK を遠心分離で集め、少量の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解後、予め 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化しておいたセファデックス G-25 (ファルマシア製、スウェーデン) カラムで分子篩脱塩を行い、得られる脱塩液を凍結乾燥した。かくして比活性 20 単位/

で 20 時間通気 (20 l / 分) 攪拌 (180 rpm) 培養した。培養液 18 l を連続遠心分離機にて処理して菌体を集め、この菌体を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) にて 4 l に懸濁した。この懸濁液をダイノミルにかけ菌体を磨砕した。磨砕後、磨砕液を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で 8 l とし、不溶物を珪藻土を濾過助剤として濾別した。得られた濾液にまず 38 % 飽和になる様に硫酸アンモニウムを加え、不溶物を遠心分離で沈殿として除去した後、その上清に更に終末 65 % 飽和になる様に更に硫酸アンモニウムを加え、GK を沈殿として回収した。この沈殿としての活性回収率は 90 % で、比活性は約 6 倍に上昇していた。得られた沈殿を 4 l の 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.5 に調整後、50 % 飽和になる様に硫酸アンモニウムを加え、再度 GK を遠心分離にて塩析物として回収した。得られた沈殿物を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) の 400 ml に溶解し、溶解液中の硫酸アンモニウム濃度が 6 % 飽和になる様に硫酸アンモニウムを

加の GK 約 1.1 g が得られた。粗抽出液からの活性回収率は 45 % であり、比活性の上昇は 200 倍に達した。

実施例 2

使用菌株にコリネバクテリウム、ゼロシス^I F012684 を用い、実施例 1 と同様に培養、抽出、精製を行い、比活性 1.8 単位 / ml の精製 GK 約 0.5 g を得た。活性収率は 40 % であつた。

特許出願人 東洋紡績株式会社

手 続 補 正 書

昭和55年4月1日

特許庁長官 川 原 能 雄 殿

1 事件の表示

昭和55年特許願第24557号

2 発明の名称

グリセロールキナーゼの製造法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

大阪市北区堂島浜二丁目1番9号

(316) 東洋紡績株式会社

代表者 宇 野 收

4 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

5 補正の内容

(1) 明細書第2頁第15行目

「特徴」を「特徴」に訂正する。

特開昭56-121484(5)

(2) 同第5頁第15行目

「 $MgCl_2$ 」を「 $MgCl_2$ 」に訂正する。

(3) 同第8頁表「反応液組成」の欄

「K-リン酸緩衝液(pH7.5)」の下に
「NADH」を挿入する。

(4) 同第8頁表「濃度 $\mu mole$ 」の欄

「75」の下に「0.255」を挿入する。

(5) 同第10頁末行

「AC」を「Ac」に訂正する。

(6) 同第11頁第18行目

「300」を「300、」に訂正する。

(7) 同第12頁第6行目

「0.05」を「0.05M」に訂正する。

(8) 同第13頁第8行目

「流した後」の次に「、」を挿入する。